



REC'D PTO 10 DEC 2004

10/517645

REC'D 26 AUG 2003

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 17 JUIN 2003

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE 1/2

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W 19C653

Réservé à l'INPI

REMISE DES PIÈCES

DATE **12 JUIN 2002**

LIEU **75 INPI PARIS**

N° D'ENREGISTREMENT **0207212**

NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE **12 JUIN 2002**
PAR L'INPI

Vos références pour ce dossier
(facultatif) **IFB 02 BN CNR AURA**

**NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**

GROSSET-FOURNIER & DEMACHY
20, rue de Maubeuge
F-75009 Paris

Confirmation d'un dépôt par télécopie

☐ N° attribué par l'INPI à la télécopie

2 NATURE DE LA DEMANDE

Demande de brevet

Demande de certificat d'utilité

Demande divisionnaire

Demande de brevet initiale

ou demande de certificat d'utilité initiale

Transformation d'une demande de
brevet européen *Demande de brevet initiale*

Cochez l'une des 4 cases suivantes

☒

☐

☐

N°

N°

☐

N°

Date

Date

Date

3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

**ANTICOPRS MONOCLONAL ANTI-AURORA-A, SON PROCEDE D'OBTENTION, ET SES
UTILISATIONS DANS LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DES CANCERS**

4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ

OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE

LA DATE DE DÉPÔT D'UNE

DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

Pays ou organisation

Date

N°

☐ S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»

5 DEMANDEUR

Nom ou dénomination sociale

Prénoms

Forme juridique

N° SIREN

Code APE-NAF

Adresse

Rue

Code postal et ville

Pays

Nationalité

N° de téléphone (facultatif)

N° de télécopie (facultatif)

Adresse électronique (facultatif)

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

3, rue Michel-Ange

F-75794 | PARIS CEDEX 16

FRANCE

FRANCAISE

<p align="center">Réservé à l'INPI</p> <p>REMISE DES PIÈCES DATE 12 JUIN 2002 LIEU 75 INPI PARIS N° D'ENREGISTREMENT 0207212 NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI</p>		
<p>Vos références pour ce dossier : <i>(facultatif)</i></p>		<p>IFB 02 BN CNR AURA</p>
<p>6 MANDATAIRE</p> <p>Nom Prénom Cabinet ou Société</p> <p>N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel</p> <p>Adresse Rue Code postal et ville N° de téléphone <i>(facultatif)</i> N° de télécopie <i>(facultatif)</i> Adresse électronique <i>(facultatif)</i></p>		<p>DEMACHY Charles GROSSET-FOURNIER & DEMACHY</p> <p>20, rue de Maubeuge 75009 PARIS 01.42.81.09.58 01.42.81.08.71</p>
<p>7 INVENTEUR (S)</p> <p>Les inventeurs sont les demandeurs</p>		<p><input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non Dans ce cas fournir une désignation d'inventeur(s) séparée</p>
<p>8 RAPPORT DE RECHERCHE</p> <p>Établissement immédiat ou établissement différé</p> <p>Paiement échelonné de la redevance</p>		<p>Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/></p> <p>Paiement en deux versements, uniquement pour les personnes physiques</p> <p><input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non</p>
<p>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</p>		<p>Uniquement pour les personnes physiques</p> <p><input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention <i>(joindre un avis de non-imposition)</i> <input type="checkbox"/> Requête antérieurement à ce dépôt <i>(joindre une copie de la décision d'admission pour cette invention ou indiquer sa référence)</i></p>
<p>Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes</p>		
<p>10 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</p> <p>Charles DEMACHY Mandataire 422.5/PP.170</p>		<p>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</p>

ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-AURORA-A, SON PROCÉDE D'OBTENTION, ET SES UTILISATIONS DANS LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DES CANCERS

5

La présente invention a pour objet un anticorps monoclonal dirigé contre la kinase aurora-A des mammifères, son procédé d'obtention, ainsi que ses utilisations dans le cadre du diagnostic ou du pronostic de cancers, et dans des compositions pharmaceutiques dans le cadre du traitement des cancers.

10 La protéine kinase aurora-A est un oncogène, sa surexpression dans des cellules Rat-1 suffit à provoquer l'apparition d'un phénotype transformé et l'implantation de ces cellules transformées dans des souris immunodéficientes induit l'apparition de tumeurs. (Bischoff et al., 1998 ; Zhou et al., 1998). Le gène codant pour cette kinase est localisé sur le chromosome 20 en 20q13, amplicon fréquemment détecté dans de nombreuses

15 tumeurs (sein, colon, cancer gastriques).

La surexpression de la protéine kinase aurora-A a été observée dans de nombreuses tumeurs. De manière très intéressante la présence de cette kinase en quantité anormale n'est pas corrélée à une prolifération détectée par coloration avec un marqueur spécifique de la prolifération tel que PCNA. Aurora-A est donc un marqueur

20 spécifique de l'aspect tumoral des cellules (Tanaka et al., 1999 ; Takahashi et al., 2000).

Aurora-A fait partie d'une famille multigénique de protéines kinases appelées aurora, elle comporte trois membres : aurora-A (décrite précédemment) aurora-B (Prigent et al., 1999) et aurora-C (Bernard et al., 1998). Bien que seule aurora-A ait un réel pouvoir oncogène les deux autres kinases ont également été retrouvées

25 surexprimées dans les mêmes tumeurs (Giet et Prigent, 1999).

L'amplification du gène codant pour aurora-A est associée à la présence d'une activité anormalement élevée de la protéine kinase dans ces tumeurs. De plus la surexpression ectopique de cette kinase dans des cellules en culture suffit à provoquer l'apparition d'un phénotype transformé, ces cellules transplantées dans des souris

30 immunodéficientes induisent l'apparition de tumeurs.

La surexpression de la kinase aurora-A est très étroitement liée à l'état cancéreux d'une cellule. Cette surexpression de la kinase aurora-A induit une polyploïdie des cellules et provoque une amplification des centrosomes, deux événements préfigurant un mauvais pronostic du cancer du sein par exemple.

Il est donc important de pouvoir mesurer précisément l'expression de cette kinase dans les pathologies cancéreuses, tant au niveau ARNm que protéine.

Or la mesure de l'expression de la protéine kinase aurora-A dépend entièrement de l'utilisation d'un bon anticorps monoclonal.

5 Toutefois, aucun anticorps monoclonal suffisamment spécifique dirigé contre la protéine kinase humaine aurora-A n'est disponible dans le commerce.

La présente invention a pour but de fournir un anticorps monoclonal anti-aurora-A fiable, se liant à cette protéine avec une spécificité et une sensibilité suffisante pour envisager son utilisation à des fins de recherche expérimentale, ainsi que dans le

10 domaine du diagnostic, du pronostic et du traitement des cancers.
L'invention concerne un anticorps monoclonal anti-aurora-A, encore désigné anticorps 35C1, reconnaissant spécifiquement la kinase aurora-A humaine et murine, et ayant les propriétés suivantes :

* il peut se fixer sur les membranes contenant la protéine aurora-A humaine ou
15 murine,

* il permet de détecter, et, le cas échéant, de purifier, la protéine aurora-A humaine et murine par immunoprécipitation,

* il permet la coloration des tissus biologiques où est sécrétée la protéine aurora-A et,
20

* il n'inhibe pas l'activité enzymatique de la protéine aurora-A humaine et murine, ledit anticorps monoclonal étant tel qu'obtenu par :

– cinq injections espacées de quinze jours à des souris de protéine kinase aurora-A recombinante produite par des bactéries *E. coli* transformées avec un vecteur d'expression bactérien dans le génome duquel a été inséré l'ADNc humain codant pour aurora-A, sacrifice desdites souris, et fusion entre des cellules de la rate de ces
25 souris et des cellules de hamster immortalisées en culture pour obtenir des hybridomes,

– criblage des hybridomes produisant un anticorps capable d'immunoprécipiter la protéine recombinante utilisée pour l'immunisation des souris lors de l'étape précédente, et récupération des hybridomes positifs après ce premier crible,
30

– criblage des hybridomes récupérés à l'étape précédente, produisant un anticorps capable d'immunoprécipiter la protéine endogène aurora-A à partir d'un extrait de cellules humaines HeLa en culture, et récupération des hybridomes positifs après ce deuxième crible,

– criblage des hybridomes récupérés à l'étape précédente, produisant un anticorps capable de reconnaître en immunofluorescence indirecte les centrosomes et les pôles du fuseau mitotique de cellules humaines en culture, et récupération des hybridomes positifs après ce troisième crible,

5 – criblage des hybridomes récupérés à l'étape précédente, produisant un anticorps capable d'immunoprécipiter la protéine endogène aurora-A de souris à partir d'un extrait de cellules murines en culture, et récupération des hybridomes positifs après ce quatrième crible,

10 – criblage des hybridomes récupérés à l'étape précédente, produisant un anticorps capable de reconnaître en immunofluorescence indirecte les centrosomes et les pôles du fuseau mitotique de cellules murines en culture,

– récupération et purification par clonage d'un hybridome positif après l'étape de criblage précédente, et produisant un anticorps monoclonal possédant l'ensemble des propriétés définies ci-dessus.

15 L'invention a également pour objet l'utilisation de l'anticorps monoclonal 35C1 défini ci-dessus, pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro*, ou de pronostic de cancers chez l'homme ou l'animal.

20 L'invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation de l'anticorps monoclonal 35C1 défini ci-dessus, pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro*, ou de pronostic, de tumeurs solides, tels que les cancers du sein, les cancers gastriques et les cancers colorectaux.

25 L'invention concerne également l'utilisation susmentionnée de l'anticorps monoclonal 35C1 défini ci-dessus, en association avec un marqueur de prolifération cellulaire, tel qu'un marqueur de la protéine PCNA (Tanaka et al., 1999 ; Takahashi et al., 2000).

L'invention a également pour objet toute méthode de diagnostic *in vitro*, ou de pronostic, de cancers tels que définis ci-dessus, chez l'homme ou l'animal, caractérisée en ce qu'elle comprend :

30 – la mise en présence de l'anticorps monoclonal 35C1 défini ci-dessus, avec un échantillon biologique prélevé chez un individu, ledit anticorps étant le cas échéant fixé sur un support solide,

– la détection, et le cas échéant la quantification, de la protéine aurora-A susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique à l'aide de réactifs marqués, notamment d'anticorps marqués, reconnaissant soit l'anticorps monoclonal lié à ladite

protéine aurora-A, soit la protéine aurora-A liée audit anticorps monoclonal dans les complexes formés lors de l'étape précédente entre l'anticorps monoclonal et la protéine aurora-A susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique, et ce, le cas échéant, après rinçage approprié du support solide.

5 Avantageusement, dans le cadre de la méthode susmentionnée, la détermination d'une quantité de protéine aurora-A inférieure ou supérieure à un seuil physiologique déterminé en fonction de l'échantillon biologique, témoigne respectivement d'un bon ou d'un mauvais pronostic du cancer diagnostiqué.

10 L'invention a également pour objet, un kit pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic définie ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend :

- l'anticorps monoclonal 35C1 défini ci-dessus,

- le cas échéant, un marqueur de prolifération cellulaire, tel qu'un marqueur de la protéine PCNA, notamment un anticorps anti-PCNA.

15 L'invention concerne également l'utilisation de l'anticorps monoclonal 35C1 défini ci-dessus, pour la préparation de médicaments destinés au traitement de cancers, tels que les cancers du sein, les cancers colorectaux et les cancers gastriques.

A ce titre, l'invention a plus particulièrement pour objet toute composition pharmaceutique, contenant l'anticorps monoclonal 35C1 défini ci-dessus en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

20 L'invention a également pour objet l'utilisation de l'anticorps monoclonal 35C1 défini ci-dessus, pour la mise en œuvre d'une méthode de criblage d'inhibiteurs de la kinase aurora-A dans laquelle la baisse de l'activité de cette kinase est mesurée à l'aide dudit anticorps.

25 L'invention a plus particulièrement pour objet toute méthode de criblage d'inhibiteurs de la kinase aurora A caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- le traitement de cellules, telles que des lignées dérivées de différents cancers (sein, colon etc...), par l'inhibiteur testé,

30 - immunoprécipitation de la protéine kinase aurora-A à l'aide de l'anticorps monoclonal 35C1 défini ci-dessus, et mesure de l'activité kinase, notamment selon la méthode décrite dans le paragraphe 3. g) ci-après.

L'invention concerne également le procédé de préparation de l'anticorps monoclonal 35C1 défini ci-dessus, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

– cinq injections espacées de quinze jours à des souris de protéine kinase aurora-A recombinante produite par des bactéries *E. coli* transformées avec un vecteur d'expression bactérien dans le génome duquel a été inséré l'ADNc humain codant pour aurora-A, sacrifice desdites souris, et fusion entre des cellules de la rate de ces souris et des cellules de hamster immortalisées en culture pour obtenir des hybridomes,

– criblage des hybridomes produisant un anticorps capable d'immunoprécipiter la protéine recombinante utilisée pour l'immunisation des souris lors de l'étape précédente, et récupération des hybridomes positifs après ce premier crible,

– criblage des hybridomes récupérés à l'étape précédente, produisant un anticorps capable d'immunoprécipiter la protéine endogène aurora-A à partir d'un extrait de cellules humaines HeLa en culture, et récupération des hybridomes positifs après ce deuxième crible,

– criblage des hybridomes récupérés à l'étape précédente, produisant un anticorps capable de reconnaître en immunofluorescence indirecte les centrosomes et les pôles du fuseau mitotique de cellules humaines en culture, et récupération des hybridomes positifs après ce troisième crible,

– criblage des hybridomes récupérés à l'étape précédente, produisant un anticorps capable d'immunoprécipiter la protéine endogène aurora-A de souris à partir d'un extrait de cellules murines en culture, et récupération des hybridomes positifs après ce quatrième crible,

– criblage des hybridomes récupérés à l'étape précédente, produisant un anticorps capable de reconnaître en immunofluorescence indirecte les centrosomes et les pôles du fuseau mitotique de cellules murines en culture,

– récupération et purification par clonage d'un hybridome positif après l'étape de criblage précédente, et produisant un anticorps monoclonal possédant l'ensemble des propriétés définies ci-dessus.

L'invention sera davantage illustrée à l'aide de la description détaillée de l'anticorps monoclonal 35C1 défini ci-dessus et de son procédé d'obtention.

Le cDNA humain codant pour aurora-A (SEQ ID NO : 1) a été inséré dans un vecteur d'expression bactérien (pET29 Novagene).

La protéine kinase a été produite dans des bactéries BL21 (DE3)pLysS et purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne Ni-NTA-agarose (Qiagen).

La protéine purifiée au laboratoire a ensuite été injectée à des souris (BALB/c).

Après cinq injections espacées de 15 jours la souris a été sacrifiée et une fusion a été effectuée entre des cellules de la rate de la souris et des cellules de hamster immortalisées en culture pour obtenir des hybridomes.

Les hybridomes obtenus au nombre de 960 ont alors été testés pour leur capacité à produire un anticorps reconnaissant en western blot la protéine utilisée pour l'immunisation.

Les hybridomes positifs après ce premier crible ont alors été testés en western blot pour leur capacité à reconnaître la protéine endogène aurora-A à partir d'un extrait de cellules humaines HeLa en culture.

Les hybridomes positifs après ce deuxième crible ont été testés pour leur capacité à reconnaître en immunofluorescence indirecte les centrosomes et les pôles du fuseau mitotiques de cellules humaines en culture.

Les hybridomes positifs après ce troisième crible ont alors été testés en western blot pour leur capacité à reconnaître la protéine endogène aurora-A de souris à partir d'un extrait de cellules murines en culture.

Les hybridomes positifs après ce quatrième crible ont été testés pour leur capacité à reconnaître en immunofluorescence indirecte les centrosomes et les pôles du fuseau mitotiques de cellules murines en culture.

Un hybridome répondant à tous ces critères a été retenu et cloné pour obtenir un clone pur. Ce clone a été baptisé 35C1.

Il sécrète un anticorps monoclonal anti-aurora-A qui reconnaît la kinase aurora-A humaine et murine.

Cet anticorps monoclonal anti-aurora-A reconnaissant spécifiquement la kinase aurora-A humaine et murine a les propriétés suivantes :

- il peut-être utilisé en Western-blot (immunodétection indirecte de la protéine sur membrane de nitrocellulose ou nylon)
- il permet de localiser la protéine dans des cellules en culture par immunodétection indirecte
- il n'inhibe pas l'activité enzymatique de la kinase in vitro
- il permet de purifier la kinase aurora-A d'extrait acellulaire par immunoprécipitation

• puisqu'il n'inhibe pas l'activité kinase de aurora-A il peut être utilisé pour doser l'activité kinase dans des extraits protéiques préparés à partir de tissus présentant des pathologies.

5

1) Purification de la protéine aurora-A recombinante

10

15

20

Le cDNA codant pour la kinase aurora-A humaine a été cloné dans le vecteur d'expression bactérien pET29 (fournisseur Novagen) qui permet de produire une protéine recombinante contenant 6 résidus histidine supplémentaires. La souche de bactérie *E. coli* BL21(DE3) pLysS (fournisseur Promega) qui est déficiente en protéase et qui s'autolyse par production de lysozyme après décongélation (toutes ces propriétés facilitent la purification de protéines) a été utilisée. La surexpression de la protéine aurora-A-(His)6 dans les bactéries en phase de croissance ($DO_{600} = 0,6$) est induite à 22°C par addition de 1 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactoside) pendant 4 heures. Les bactéries sont ensuite lysées à 4°C en utilisant en plus de leur propriété autolytique, du lysozyme et des ultrasons. La protéine aurora-A-(His)6 est ensuite purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel (Ni-NTA-agarose (fournisseur Qiagen)). La protéine est éluée par 250 mM imidazole suivant les instructions Qiagen. La protéine purifiée est ensuite passée sur centricon YM-10 (fournisseur Millipore) pour la placer dans une solution de PBS (NaCl 136 mM, KCl 26 mM, Na_2HPO_4 2 mM, KH_2PO_4 2 mM, pH 7,2). Des fractions de 15 μ g de protéine ont été préparées, lyophilisées et conservées à 4°C.

25

30

2) Immunisation de la souris

Une souris BALB/c a été immunisée par voie intra-péritonéale avec 15 μ g de protéine aurora-A recombinante diluée dans 50% d'adjuvant de Freund complet (fournisseur Sigma). La souris a ensuite été injectée deux fois 15 μ g de protéine aurora-A recombinant diluée dans 50% d'adjuvant de Freund incomplet avec trois semaines d'intervalle. Lorsque des anticorps anti-aurora-A ont été détectés dans le sang de la souris, elle a été sacrifiée et la rate prélevée. Des cellules en suspension ont été obtenues à partir de cette rate par homogénéisation avec un Dounce.

Ces cellules de rate ont été fusionnées avec des cellules SP2/O-Ag14 provenant d'un myélome murin et obtenues auprès de l'ECACC (Shulman et al., 1978). Une fusion a été effectuée entre $100 \cdot 10^6$ cellules de rate et $20 \cdot 10^6$ cellules SP2/O-Ag14 dans 50% de polyéthylène glycol 1500 (fournisseur Roche) pendant 90 mn à 37°C. Les

cellules ont ensuite été distribuées dans des boîtes 10 x 96 puits contenant un milieu de sélection HAT (fournisseur Sigma Chemicals).

3) Crible des hybridomes

a) ELISA

100 µl de PBS contenant 4 µg/ml de protéine recombinante aurora-A ont été déposés dans chaque puits de plaques Elisa (plaques 96 puits) et incubé 36 heures à 4°C. Après deux lavages avec du PBS les puits sont remplis de PBS contenant 3% de BSA (Albumine Sérique Bovine, fournisseur Sigma) et les plaques sont incubées une nuit à 4°C. Le lendemain 100 µl de chaque surnageant de fusion est transféré dans ces plaques 96 puits contenant aurora-A recombinante. Les plaques sont incubées à température ambiante pendant 2 heures. Après deux lavages avec du PBS/BSA, les plaques sont incubées avec un anticorps anti-souris couplé à la phosphatase (Sigma Biochemical). Les puits sont ensuite lavés deux fois avec du PBS et une fois avec une solution AP (100 mM Tris pH 9.5, 100 mM NaCl and 5 mM MgCl₂). La présence d'un anticorps monoclonal est détectée après remplissage des puits avec 50 µl de solution AP contenant le substrat synthétique de phosphatase (Nitro-4-phenyl phosphate disodique hexahydrate salt) à 5 mg/ml (fournisseur Merck) et par l'apparition d'une coloration jaune dans le puits.

b) Western blot contre la protéine recombinante

Dix plaques 96 puits (8x12) ont été analysées par tests ELISA sans donner de résultats très reproductifs. Ces plaques ont alors été testées par Western blot effectués de la manière suivante. La protéine recombinante aurora-A a été soumise à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide-SDS et transférée sur membrane de nitrocellulose selon la technique décrite précédemment (Roghi et al., 1998). Les membranes ont été découpées pour isoler la région correspondant à l'emplacement où migrait la protéine aurora-A. Les bouts de membranes ont été bloqués par incubation dans une solution de TBST (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) contenant 5% de lait pendant 2 heures à 4°C. Chaque bout de membrane a ensuite été incubé avec les surnageants de cellule dilués au 1:100 dans une solution de TBST contenant 2.5% de lait pendant 1 h à 4°C. Les immuno-complexes ont été identifiés en utilisant soit un second anticorps anti-souris couplé à la peroxidase ou à la phosphatase

(fournisseur Sigma Chemicals) à la dilution préconisée par le fabricant. La révélation de la réaction a été effectuée par la technique de chemiluminescence pour la peroxydase (fournisseur Amersham Pharmacia Biotech) selon les indications du fournisseur ou par colorimétrie pour la phosphatase en utilisant les deux substrats NBT/BCIP (fournisseur Sigma Chemicals) selon les indications du fournisseur.

Les puits de chaque plaque ont été regroupés par pools de 8 correspondant à chaque colonne de chaque plaque. La présence de monoclonaux a été analysée dans chaque pool par Western blot contre la protéine recombinante aurora-A. Sur les 120 pools testés seuls 19 ont donné une réponse positive.

Chacun des 8 puits correspondant à chaque pool positif a été testé séparément par la même technique de Western blot dans le but d'identifier quel(s) puits contenait(ent) des anticorps. La figure 1 montre un exemple de résultats obtenus avec le pool numéro 2, dans ce cas particulier seuls les puits A et B contenaient des anticorps, le puits ayant été retenu.

Sur les 120 pools testés seuls 19 ont été retenus parce qu'ils donnaient une très forte réponse positive. Dans ces 19 pools seuls 23 puits contenaient des anticorps dirigés contre la protéine aurora-A recombinante.

c) Western blot contre la protéine aurora-A humaine endogène

La même technique de Western blot a cette fois été utilisée pour identifier les surnageants capable de reconnaître la protéine aurora-A parmi toutes les protéines d'un extrait acellulaire total préparé à partir de cellules humaines en culture.

Les cellules choisies sont des cellules HeLa. Les extraits ont été préparés à partir de boîte de culture contenant environ 10^6 cellules, les cellules ont été lysées dans leur boîte par 1 ml de solution dite Laemmli correspondant à la solution de dépôt sur gel polyacrylamide-SDS (Laemmli 1970), la solution a été incubée 10 min à 90°C, soniquée et centrifugée, 10 µl du surnageant est déposé sur le gel.

Parmi les 23 surnageant ayant été sélectionnés précédemment seul 12 contenait un anticorps capable de reconnaître une protéine de 46 kD (taille attendue pour aurora-A) par Western blots effectués sur des extrait de cellules Hela.

d) Immunofluorescence sur cellules humaines

Une étape supplémentaire a été introduite dans le crible pour sélectionner les anticorps qui étaient capable de décorer le centrosome dans des cellules humaines en

culture. Le choix des cellules s'est porté la lignée cellulaire MCF7 dérivant d'un cancer du sein car la protéine aurora-A a été rapportée surexprimée dans ces cellules.

La technique utilisée est l'immunofluorescence indirecte. Les cellules sont cultivées sur des lamelles rondes en verre dans les boîtes 12 puits (fournisseur Corning Inc) pendant 48 heures. Les lamelles sont ensuite lavées par une solution de PBS et les cellules fixées par du méthanol froid (-20°C). Les cellules sont ensuite incubées 30 mn à température ambiante dans du PBS contenant de la BSA 3%. Après trois lavages par du PBS les lamelles sont incubées avec les surnageant d'hybridome dilués au 1:50 dans du PBS pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules sont a nouveau lavées trois fois par du PBS et incubées à température ambiante pendant 1 heure avec un second anticorps anti-souris couplé à la fluorescéine « FITC » (fournisseur Sigma Chemicals). Les lamelles sont lavées trois fois par du PBS et les cellules montées entre lame et lamelle dans du Mowiol contenant de l'antifading. Les observations ont été effectuées avec un microscope fluorescent Leica DMRXA et les images prises avec une caméra noir et blanc (COHU) ont été traitées par le logiciel Leica Qfish.

Sur les 12 surnageants retenus précédemment seuls 4 contenaient des anticorps capables de décorer les centrosomes et les pôles du fuseau mitotique des cellules MCF7. Cette localisation correspond exactement à celle attendue pour la kinase aurora-A.

e) Western blot contre la protéine aurora-A murine endogène

Dans le but d'augmenter la sélectivité du crible nous avons testé les 4 surnageants contre la protéine orthologue de aurora-A chez la souris. Un premier crible a été effectué par Western blot contre des extraits acellulaires de cellules de souris en culture, cellules m-ICc12. Les extraits acellulaires ont été préparés comme pour les cellules humaines et le Western blots effectués de la même manière que précédemment. Deux des surnageant étaient capable de reconnaître une protéine de 46 kD (taille également attendue pour la kinase aurora-A murine)

f) Immunofluorescence sur cellules murines

Nous avons contrôlé si les deux surnageants précédemment identifiés en Western blot étaient capable de décorer les centrosomes de cellules de souris en culture. Nous avons choisi les cellules LLC1 car elles présentent un index mitotique très élevé. Seul un des deux anticorps a été capable de localiser une protéine dans les centrosomes et

aux pôles du fuseau mitotique, localisations attendues pour la protéine kinase aurora-A de souris.

g) Dosage de l'activité kinase aurora-A

Les mesures de l'activité kinase aurora-A ont été effectuées dans 20 µl de Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, DTT 1 mM, MgCl₂ 10 mM, et ATP 10 µM dont 1 µCi de [γ -³²P] ATP 3000 Ci/mmele (fournisseur Amersham Pharmacia Biotech) contenant 4 µg de protéine basique de la myéline (MBP) pour la figure 5 (fournisseur Sigma Chemicals) ou 10 µl d'un extrait de bactéries ayant produit la protéine GST-H3 pour la figure 6. Les réactions sont incubées à 37°C pendant 10 min. 10 µl de la réaction sont analysés soit en comptage (figure 5) soit après migration sur gel de polyacrylamide-SDS, séché et examiné en autoradiographie (figure 6).

h) Clonage du monoclonal sélectionné

Le surnageant que nous avons sélectionné contenait un mélange hétérogène de cellules obtenus après la fusion. Nous avons repiqué ces cellules en effectuant une dilution limite et obtenu 20 clones. Le surnageant de ces 20 clones a été testé en Western blot contre la protéine recombinante aurora-A, 8 ont donné une réponse positive. Ces 8 surnageants ont été testés sur des extraits de cellules humaines HeLa, de cellules murines m-ICc12. Seuls deux surnageants ont été retenus.

Ces deux surnageants ont à nouveau été re-clonés par dilution limite et re-testés comme précédemment. Ce dernier clonage avait pour but de sélectionner un clone qui maintenait un niveau de production d'anticorps reproductible après repiquage.

Seul un des deux clone s'est avéré stable, il a été baptisé 35C1 et retenu pour stockage et production de monoclonal.

i) Propriétés du monoclonal 35C1 (voir les figures)

L'anticorps reconnaît spécifiquement que la protéine kinase aurora-A humaine et murine en Western blot dans des extraits acellulaire totaux (figure 1).

Il localise la protéine kinase aurora-A dans des cellules humaines et dans des cellules murines en culture (figure 3).

Il immunoprécipite la protéine aurora-A d'extraits de cellules humaine MCF7 (figure 4).

Il n'inhibe pas l'activité kinase de aurora-A (figure 5).

Il permet donc d'immuno-précipiter la protéine aurora-A et de mesurer son activité kinase alors qu'elle est toujours associée à l'anticorps (figure 6)

Ces propriétés du monoclonal 35C1 en font un outil de choix pour l'étude de la protéine kinase aurora-A.

Il peut être utilisé dans des méthodes de diagnostic et de pronostic de tumeurs solides. Le niveau d'expression de l'ARNm codant pour la protéine aurora-A est étroitement corrélée avec l'instabilité génétique des cellules de cancer du sein et avec un grade élevé de la tumeur (Miyoshi et al. 2001). Ceci a été très clairement établi pour le cancer du sein. Par contre en raison de l'absence d'anticorps monoclonal suffisamment spécifique, cette corrélation entre la quantité d'ARNm aurora-A et le grade du cancer n'a pas encore pu être vérifiée au niveau protéique. Le monoclonal 35C1 anti-aurora-A permettra ce type de mesures. Il permet d'une part de mesurer la quantité de protéine aurora-A (Western blot et immunohistochimie) et d'autre part de mesurer l'activité aurora-A (immunoprécipitation) dans des tumeurs, et ainsi de déterminer le seuil de la quantité d'aurora-A au-dessous et au-dessus duquel le pronostic d'un cancer déterminé sera bon ou mauvais respectivement.

Par ailleurs, l'anticorps 35C1 permet de tester l'efficacité d'inhibiteurs de l'activité kinase aurora-A *in vivo*. La protéine kinase aurora-A est immunoprécipitée de cellules HeLa par exemple préalablement traitées par l'inhibiteur et son activité mesurée *in vivo*. Ceci permet entre autre d'évaluer la stabilité des inhibiteurs *in vivo*.

Références bibliographiques

Bernard M, Sanseau P, Henry C, Couturier A, Prigent C. Cloning of STK13, a third human protein kinase related to Drosophila aurora and budding yeast Ipl1 that maps on chromosome 19q13.3-ter. Genomics. 1998 Nov 1;53(3):406-9.

Bischoff JR, Anderson L, Zhu Y, Mossie K, Ng L, Souza B, Schryver B, Flanagan P, Clairvoyant F, Ginther C, Chan CS, Novotny M, Slamon DJ, Plowman GD. A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. EMBO J 1998 Jun 1;17(11):3052-65.

Giet R, Prigent C. Aurora/Ipl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases. J Cell Sci 1999 Nov;112 (Pt 21):3591-601.

Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(259):680-5.

Miyoshi Y, Iwao K, Egawa C, Noguchi S. Association of centrosomal kinase STK15/BTAK mRNA expression with chromosomal instability in human breast cancers. *Int J Cancer* 2001 May 1;92(3):370-3.

Prigent C, Gill R, Trower M, Sanseau P. In silico cloning of a new protein kinase, Aik2, related to *Drosophila* Aurora using the new tool: EST Blast. *In Silico Biol* 1999;1(2):123-8.

Roghi C, Giet R, Uzbekov R., Morin N, Chartrain I, Le Guellec R, Couturier A, Doree M, Philippe M, Prigent C. The *Xenopus* protein kinase pEg2 associates with the centrosome in a cell cycle-dependent manner, binds to the spindle microtubules and is involved in bipolar mitotic spindle assembly. *J Cell Sci*. 1998 Mar;111 (Pt 5):557-72.

Shulman M, Wilde CD, Kohler G. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature* 1978 Nov 16;276(5685):269-70.

Takahashi T, Futamura M, Yoshimi N, Sano J, Katada M, Takagi Y, Kimura M, Yoshioka T, Okano Y, Saji S. (2000) Centrosomal kinases, HsAIRK1 and HsAIRK3, are overexpressed in primary colorectal cancers. *Jpn J Cancer Res* 91(10):1007-14

Takahashi T, Futamura M, Yoshimi N, Sano J, Katada M, Takagi Y, Kimura M, Yoshioka T, Okano Y, Saji S. Centrosomal kinases, HsAIRK1 and HsAIRK3, are overexpressed in primary colorectal cancers. *Jpn J Cancer Res* 2000 Oct;91(10):1007-14.

Tanaka T, Kimura M, Matsunaga K, Fukada D, Mori H, Okano Y. Centrosomal kinase AIK1 is overexpressed in invasive ductal carcinoma of the breast. *Cancer Res* 1999 May 1;59(9):2041-4.

Zhou H, Kuang J, Zhong L, Kuo WL, Gray JW, Sahin A, Brinkley BR, Sen S. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet*. 1998 Oct;20(2):104-6.

Légende des figures

Légende de la figure 1: Crible des hybridomes par western blot. La protéine recombinante aurora-A purifiée a été déposée sur gel de polyacrylamide-SDS et transférée sur une membrane de nitrocellulose. La membrane a été colorée au rouge ponceau et la bande correspondant à aurora-A découppée. Chaque panneau correspond à

un morceau de membrane avec aurora-A. Après fusion les cellules ont été distribuées dans des boîtes 96 puits. Pour cribler la présence de monoclonaux anti-aurora-A des aliquots des surnageants des puits de chaque colonne sont regroupés en pools, ceci pour chaque boîte. Chaque pool est ensuite testé en western blot colonne de droite de 1 à 12. 5 Lorsqu'un pool est considéré comme positif, ici le pool numéro 1, les surnageants de chaque puits constituant ce pool (de A à H) sont re-testé individuellement. Dans ce cas précis les puits A et B contenaient des anticorps, mais seul le puits B a été retenu.

Légende figure 2 : Western blot. Les extraits acellulaires totaux sont séparés sur 10 gel de polyacrylamide SDS et le gel est transféré sur membrane de nitrocellulose. Le puits 1 ne contient pas d'extrait et le puit 2 contient 10 µl d'extrait (correspondant à 10⁶ cellules par ml). L'anticorps est utilisé à une dilution de 1/100. Seule la protéine aurora-A de 46 kD est détectée.

15 Légende figure 3 : Immunodétection indirecte de aurora-A dans des cellules humaines et murines. Les cellules humaines sont des MCF7 et les cellules murines des LLC1. Sont détectés en immunofluorescence l'ADN par coloration DAPI (bleu), la γ-tubuline (rouge) et aurora-A (vert)

20 Légende figure 4 : Immunoprécipitation de aurora-A. La protéine est immunoprécipitée par l'anticorps 35C1 couplé à la protéine A Sepharose. Les immunoprécipités sont séparés sur un gel de polyacrylamide-SDS, le gel est transféré et les immunocomplexes révélés avec le monoclonal 35C1. Puits 1 : l'anticorps 35C1 seul ; puits 2 : immunoprécipitation effectuée avec la protéine A Sepharose seule ; puits 25 3 : immunoprécipitation effectuée avec l'anticorps monoclonal 35C1 ; puits 4 : immunoprécipitation effectuée avec un anticorps préparé au laboratoire.

30 Légende figure 5 : Activité de la kinase recombinante aurora-A humaine purifiée mesurée en présence de l'anticorps monoclonal 35C1. L'anticorps 1C1 dirigé contre la protéine aurora-A de xénope et qui ne croise pas avec la protéine humaine est utilisé comme contrôle. L'activité kinase est mesurée en utilisant la MBP (Myelin Basic Protein) comme substrat.

Légende figure 6 : Activité de la protéine aurora-A endogène immunoprécipitée par l'anticorps 35C1 fixé sur des bille de protéine A Dynabeads. L'activité de la kinase est mesurée sur un substrat ne comportant qu'une seule sérine phosphorylable. Il s'agit d'une construction GST en fusion avec la queue de l'histone H3 (avec la sérine 10). Un substrat contrôle est également utilisé où la sérine 10 est remplacée par une alanine. Les puits 1, 4 et 7 contiennent aurora-A recombinante purifiée est utilisée. Les puits 2, 5 et 8 contiennent aurora-A recombinante immunoprécipitée et fixée à l'anticorps et à la protéine A Sepharose. Les puits 3 et 6 ne contiennent pas de kinase. Les puits 3, 4 et 5 contiennent le substrat phosphorylable GST-H3(S) et les puits 6, 7 et 8 le substrat non phosphorylable GST-H3(S/A) pour les kinases.

REVENDICATIONS

1. Anticorps monoclonal anti-aurora-A, encore désigné anticorps 35C1, reconnaissant spécifiquement la kinase aurora-A humaine et murine, et ayant les propriétés suivantes :

* il peut se fixer sur les membranes contenant la protéine aurora-A humaine ou murine,

* il permet de détecter, et, le cas échéant, de purifier, la protéine aurora-A humaine et murine par immunoprécipitation,

* il permet la coloration des tissus biologiques où est sécrétée la protéine aurora-A, et

* il n'inhibe pas l'activité enzymatique de la protéine aurora-A humaine et murine, ledit anticorps monoclonal étant tel qu'obtenu par :

– cinq injections espacées de quinze jours à des souris de protéine kinase aurora-A recombinante produite par des bactéries *E. coli* transformées avec un vecteur d'expression bactérien dans le génome duquel a été inséré l'ADNc humain codant pour aurora-A, sacrifice desdites souris, et fusion entre des cellules de la rate de ces souris et des cellules de hamster immortalisées en culture pour obtenir des hybridomes,

– criblage des hybridomes produisant un anticorps capable d'immunoprécipiter la protéine recombinante utilisée pour l'immunisation des souris lors de l'étape précédente, et récupération des hybridomes positifs après ce premier crible,

– criblage des hybridomes récupérés à l'étape précédente, produisant un anticorps capable d'immunoprécipiter la protéine endogène aurora-A à partir d'un extrait de cellules humaines HeLa en culture, et récupération des hybridomes positifs après ce deuxième crible,

– criblage des hybridomes récupérés à l'étape précédente, produisant un anticorps capable de reconnaître en immunofluorescence indirecte les centrosomes et les pôles du fuseau mitotique de cellules humaines en culture, et récupération des hybridomes positifs après ce troisième crible,

– criblage des hybridomes récupérés à l'étape précédente, produisant un anticorps capable d'immunoprécipiter la protéine endogène aurora-A de souris à partir d'un extrait de cellules murines en culture, et récupération des hybridomes positifs après ce quatrième crible,

– criblage des hybridomes récupérés à l'étape précédente, produisant un anticorps capable de reconnaître en immunofluorescence indirecte les centrosomes et les pôles du fuseau mitotique de cellules murines en culture,

– récupération et purification par clonage d'un hybridome positif après l'étape de criblage précédente, et produisant un anticorps monoclonal possédant l'ensemble des propriétés définies ci-dessus.

2. Utilisation de l'anticorps monoclonal 35C1 défini dans la revendication 1, pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro*, ou de pronostic de cancers chez l'homme ou l'animal.

3. Utilisation d'un anticorps monoclonal selon la revendication 1 ou 2, pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro*, ou de pronostic, de tumeurs solides, tels que les cancers du sein, les cancers gastriques et les cancers colorectaux.

4. Utilisation selon la revendication 2 ou 3, en association avec un marqueur de prolifération cellulaire, tel qu'un marqueur de la protéine PCNA.

5. Méthode de diagnostic *in vitro*, ou de pronostic, de cancers tels que définis dans la revendication 3, chez l'homme ou l'animal, caractérisée en ce qu'elle comprend :

– la mise en présence d'un anticorps monoclonal selon la revendication 1, avec un échantillon biologique prélevé chez un individu, ledit anticorps étant le cas échéant fixé sur un support solide,

– la détection, et le cas échéant la quantification, de la protéine aurora-A susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique à l'aide de réactifs marqués, notamment d'anticorps marqués, reconnaissant soit l'anticorps monoclonal lié à ladite protéine aurora-A, soit la protéine aurora-A liée audit anticorps monoclonal dans les complexes formés lors de l'étape précédente entre l'anticorps monoclonal et la protéine aurora-A susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique, et ce, le cas échéant, après rinçage approprié du support solide.

6. Méthode selon la revendication 5, caractérisée en ce que la détermination d'une quantité de protéine aurora-A inférieure ou supérieure aux valeurs physiologiques

– criblage des hybridomes récupérés à l'étape précédente, produisant un anticorps capable de reconnaître en immunofluorescence indirecte les centrosomes et les pôles du fuseau mitotique de cellules murines en culture,

– récupération et purification par clonage d'un hybridome positif après l'étape de criblage précédente, et produisant un anticorps monoclonal possédant l'ensemble des propriétés définies ci-dessus.

2. Utilisation de l'anticorps monoclonal 35C1 défini dans la revendication 1, pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro*, ou de pronostic de cancers chez l'homme ou l'animal.

3. Utilisation d'un anticorps monoclonal selon la revendication 2, pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro*, ou de pronostic, de tumeurs solides, tels que les cancers du sein, les cancers gastriques et les cancers colorectaux.

4. Utilisation selon la revendication 2 ou 3, en association avec un marqueur de prolifération cellulaire, tel qu'un marqueur de la protéine PCNA.

5. Méthode de diagnostic *in vitro*, ou de pronostic, de cancers tels que définis dans la revendication 3, chez l'homme ou l'animal, caractérisée en ce qu'elle comprend :

– la mise en présence d'un anticorps monoclonal selon la revendication 1, avec un échantillon biologique prélevé chez un individu, ledit anticorps étant le cas échéant fixé sur un support solide,

– la détection, et le cas échéant la quantification, de la protéine aurora-A susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique à l'aide de réactifs marqués, notamment d'anticorps marqués, reconnaissant soit l'anticorps monoclonal lié à ladite protéine aurora-A, soit la protéine aurora-A liée audit anticorps monoclonal dans les complexes formés lors de l'étape précédente entre l'anticorps monoclonal et la protéine aurora-A susceptible d'être présente dans l'échantillon biologique, et ce, le cas échéant, après rinçage approprié du support solide.

6. Méthode selon la revendication 5, caractérisée en ce que la détermination d'une quantité de protéine aurora-A inférieure ou supérieure aux valeurs physiologiques

normales dans l'échantillon biologique, témoigne respectivement d'un bon ou d'un mauvais pronostic du cancer diagnostiqué.

7. Kit pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce qu'il comprend :

- un anticorps monoclonal anti-aurora A selon la revendication 1,
- le cas échéant, un marqueur de prolifération cellulaire, tel qu'un marqueur de la protéine PCNA, notamment un anticorps anti-PCNA.

8. Utilisation de l'anticorps défini dans la revendication 1, pour la préparation de médicaments destinés au traitement de cancers, tels que les cancers du sein, les cancers colorectaux et les cancers gastriques.

9. Composition pharmaceutique, contenant l'anticorps selon la revendication 1 en association avec un vecteur pharmaceutiquement acceptable.

10. Utilisation d'un anticorps monoclonal anti-aurora A selon la revendication 1, pour la mise en œuvre d'une méthode de criblage d'inhibiteurs de la kinase aurora A dans laquelle la baisse de l'activité de cette kinase est mesurée à l'aide dudit anticorps.

11. Méthode de criblage d'inhibiteurs de la kinase aurora A caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- le traitement de cellules, telles que des lignées dérivées de différents cancers, par l'inhibiteur testé,
- immunoprécipitation de la protéine kinase aurora-A à l'aide de l'anticorps selon la revendication 1, et mesure de l'activité kinase.

12. Procédé de préparation d'un anticorps monoclonal anti-aurora A selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- cinq injections espacées de quinze jours à des souris de protéine kinase aurora-A recombinante produite par des bactéries *E. coli* transformées avec un vecteur d'expression bactérien dans le génome duquel a été inséré l'ADNc humain codant pour aurora-A, sacrifice desdites souris, et fusion entre des cellules de la rate de ces

normales dans l'échantillon biologique, témoigne respectivement d'un bon ou d'un mauvais pronostic du cancer diagnostiqué.

7. Kit pour la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic selon la revendication 5 ou 6, caractérisé en ce qu'il comprend :

- un anticorps monoclonal anti-aurora A selon la revendication 1,
- le cas échéant, un marqueur de prolifération cellulaire, tel qu'un marqueur de la protéine PCNA, notamment un anticorps anti-PCNA.

8. Utilisation de l'anticorps défini dans la revendication 1, pour la préparation de médicaments destinés au traitement de cancers, tels que les cancers du sein, les cancers colorectaux et les cancers gastriques.

9. Composition pharmaceutique, contenant l'anticorps selon la revendication 1 en association avec un vecteur pharmaceutiquement acceptable.

10. Utilisation d'un anticorps monoclonal anti-aurora A selon la revendication 1, pour la mise en œuvre d'une méthode de criblage d'inhibiteurs de la kinase aurora A dans laquelle la baisse de l'activité de cette kinase est mesurée à l'aide dudit anticorps.

11. Méthode de criblage d'inhibiteurs de la kinase aurora A caractérisée en ce qu'elle comprend les étapes suivantes :

- le traitement de cellules, telles que des lignées dérivées de différents cancers, par l'inhibiteur testé,
- immunoprécipitation de la protéine kinase aurora-A à l'aide de l'anticorps selon la revendication 1, et mesure de l'activité kinase.

12. Procédé de préparation d'un anticorps monoclonal anti-aurora A selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- criblage des hybridomes produisant un anticorps capable d'immunoprécipiter la protéine recombinante utilisée pour l'immunisation de souris ayant reçues cinq injections espacées de quinze jours de protéine kinase aurora-A recombinante produite par des bactéries *E. coli* transformées avec un vecteur d'expression bactérien dans le génome duquel a été inséré l'ADNc humain codant pour aurora-A, lesdits hybridomes

souris et des cellules de hamster immortalisées en culture pour obtenir des hybridomes,

– criblage des hybridomes produisant un anticorps capable d'immunoprécipiter la protéine recombinante utilisée pour l'immunisation des souris lors de l'étape précédente, et récupération des hybridomes positifs après ce premier crible,

– criblage des hybridomes récupérés à l'étape précédente, produisant un anticorps capable d'immunoprécipiter la protéine endogène aurora-A à partir d'un extrait de cellules humaines HeLa en culture, et récupération des hybridomes positifs après ce deuxième crible,

– criblage des hybridomes récupérés à l'étape précédente, produisant un anticorps capable de reconnaître en immunofluorescence indirecte les centrosomes et les pôles du fuseau mitotique de cellules humaines en culture, et récupération des hybridomes positifs après ce troisième crible,

– criblage des hybridomes récupérés à l'étape précédente, produisant un anticorps capable d'immunoprécipiter la protéine endogène aurora-A de souris à partir d'un extrait de cellules murines en culture, et récupération des hybridomes positifs après ce quatrième crible,

– criblage des hybridomes récupérés à l'étape précédente, produisant un anticorps capable de reconnaître en immunofluorescence indirecte les centrosomes et les pôles du fuseau mitotique de cellules murines en culture,

– récupération et purification par clonage d'un hybridome positif après l'étape de criblage précédente, et produisant un anticorps monoclonal possédant l'ensemble des propriétés définies dans la revendication 1.

étant obtenus par fusion entre des cellules de la rate de ces souris et des cellules de hamster immortalisées en culture, et récupération des hybridomes positifs après ce premier crible,

5 – criblage des hybridomes récupérés à l'étape précédente, produisant un anticorps capable d'immunoprécipiter la protéine endogène aurora-A à partir d'un extrait de cellules humaines HeLa en culture, et récupération des hybridomes positifs après ce deuxième crible,

10 – criblage des hybridomes récupérés à l'étape précédente, produisant un anticorps capable de reconnaître en immunofluorescence indirecte les centrosomes et les pôles du fuseau mitotique de cellules humaines en culture, et récupération des hybridomes positifs après ce troisième crible,

15 – criblage des hybridomes récupérés à l'étape précédente, produisant un anticorps capable d'immunoprécipiter la protéine endogène aurora-A de souris à partir d'un extrait de cellules murines en culture, et récupération des hybridomes positifs après ce quatrième crible,

 – criblage des hybridomes récupérés à l'étape précédente, produisant un anticorps capable de reconnaître en immunofluorescence indirecte les centrosomes et les pôles du fuseau mitotique de cellules murines en culture,

20 – récupération et purification par clonage d'un hybridome positif après l'étape de criblage précédente, et produisant un anticorps monoclonal possédant l'ensemble des propriétés définies dans la revendication 1.

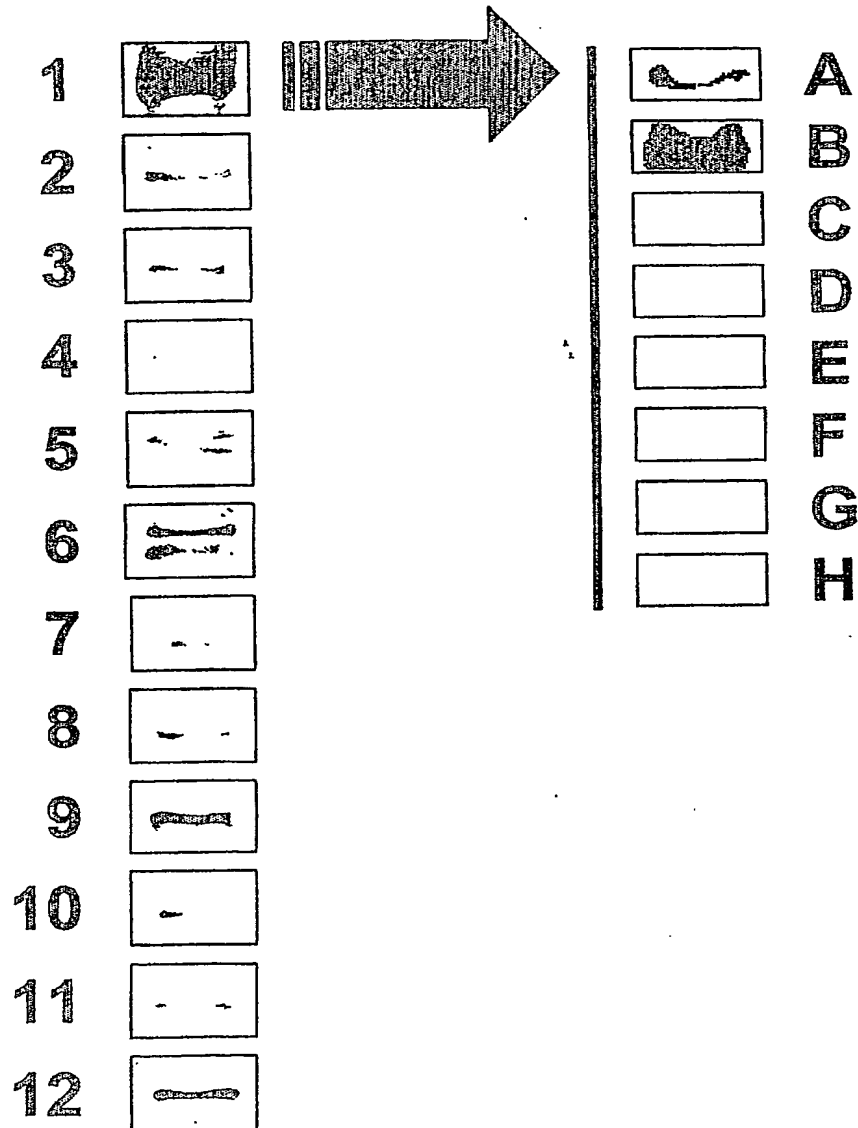


Figure 1

Anticorps 35C1

— +

**Cellules
HeLa**



← **Aurora-A
humaine**

1 2

Anticorps 35C1

— +

**Cellules
m-ICc12**

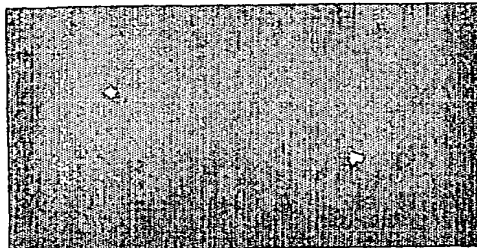


← **Aurora-A
murine**

1 2

Figure 2

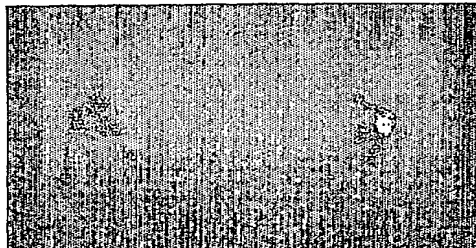
**Aurora-A
humaine**



**Cellules
MCF7**

**Aurora-A (vert)
 γ -tubulin (rouge)
DNA (bleu)**

**Aurora-A
murine**



**Cellules
LLC1**

Figure 3

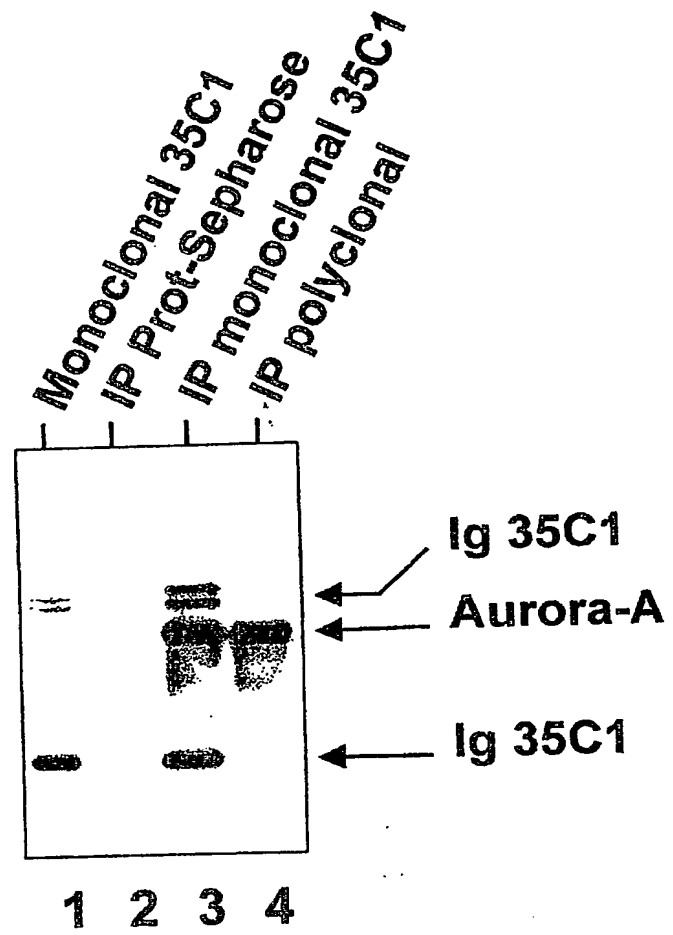


Figure 4

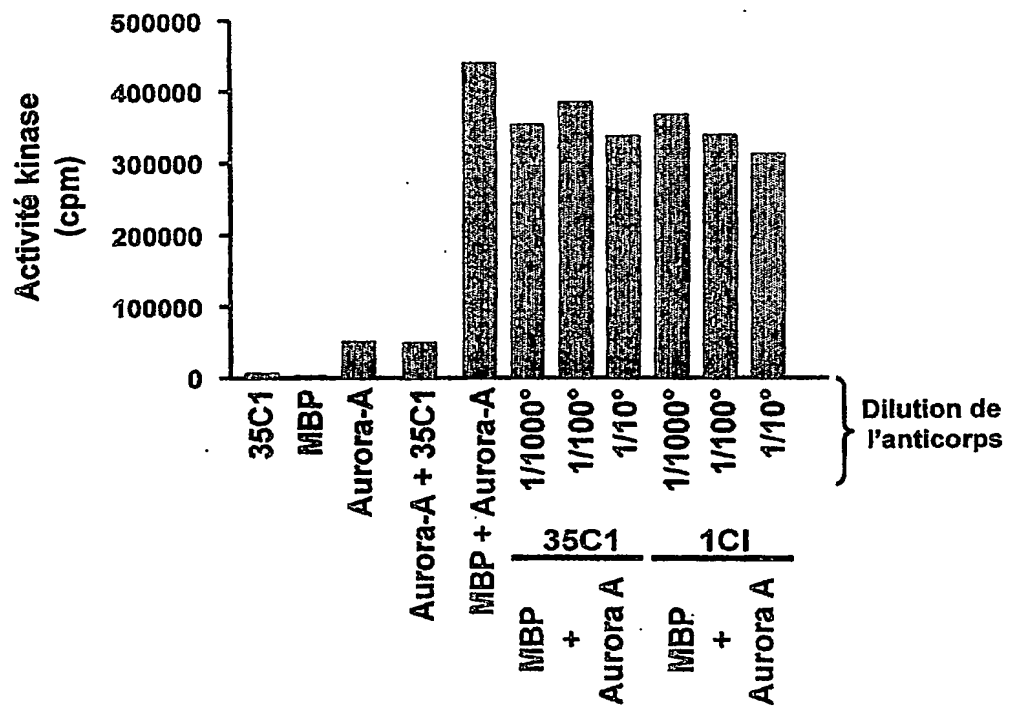


Figure 5

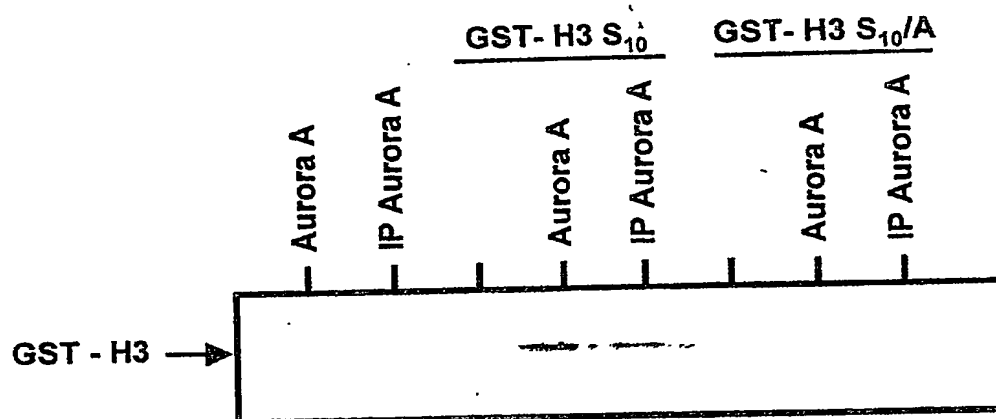


Figure 6

LISTE DE SEQUENCES

<110> CNRS

<120> ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-AURORA-A, SON PROCEDE
D'OBTENTION, ET SES UTILISATIONS DANS LE DIAGNOSTIC ET
LE TRAITEMENT DES CANCERS

<130> IFB 01 BN CNR AURA

<140>

<141>

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 2253

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (257)..(1495)

<400> 1

```

ggaagacttg ggtccttggg tcgcaggtgg gagccgacgg gtgggtagac cgtgggggat 60
atctcagtg cggacgagga cggcggggac aaggggcggc tggtcggagt ggcggagcgt 120
caagtcccct gtcggttccct ccgtccctga gtgtccttgg cgctgccttg tgcccgccca 180
gcgcccttgc atccgctcct gggcaccgag gcgccttgta ggatactgct tgttacttat 240
tacagctaga ggcacg atg gac cga tct aaa gaa aac tgc att tca gga cct 292
          Met Asp Arg Ser Lys Glu Asn Cys Ile Ser Gly Pro
            1             5             10

gtt aag gct aca gct cca gtt gga ggt cca aaa cgt gtt ctc gtg act 340
Val Lys Ala Thr Ala Pro Val Gly Gly Pro Lys Arg Val Leu Val Thr
          15             20             25

cag caa att oct tgt cag aat cca tta cct gta aat agt ggc cag gct 388
Gln Gln Ile Pro Cys Gln Asn Pro Leu Pro Val Asn Ser Gly Gln Ala
          30             35             40

cag cgg gtc ttg tgt cct tca aat tct tcc cag cgc gtt cct ttg caa 436
Gln Arg Val Leu Cys Pro Ser Asn Ser Ser Gln Arg Val Pro Leu Gln
          45             50             55             60

gca caa aag ctt gtc tcc agt cac aag ccg gtt cag aat cag aag cag 484
Ala Gln Lys Leu Val Ser Ser His Lys Pro Val Gln Asn Gln Lys Gln
          65             70             75

aag caa ttg cag gca acc agt gta cct cat cct gtc tcc agg cca ctg 532
Lys Gln Leu Gln Ala Thr Ser Val Pro His Pro Val Ser Arg Pro Leu
          80             85             90

```


aat aac acc caa aag agc aag cag ccc ctg cca tcg gca cct gaa aat	580
Asn Asn Thr Gln Lys Ser Lys Gln Pro Leu Pro Ser Ala Pro Glu Asn	
95 100 105	
aat cct gag gag gaa ctg gca tca aaa cag aaa aat gaa gaa tca aaa	628
Asn Pro Glu Glu Glu Leu Ala Ser Lys Gln Lys Asn Glu Glu Ser Lys	
110 115 120	
aag agg cag tgg gct ttg gaa gac ttt gaa att ggt cgc cct ctg ggt	676
Lys Arg Gln Trp Ala Leu Glu Asp Phe Glu Ile Gly Arg Pro Leu Gly	
125 130 135 140	
aaa gga aag ttt ggt aat gtt tat ttg gca aga gaa aag caa agc aag	724
Lys Gly Lys Phe Gly Asn Val Tyr Leu Ala Arg Glu Lys Gln Ser Lys	
145 150 155	
ttt att ctg gct ctt aaa gtg tta ttt aaa gct cag ctg gag aaa gcc	772
Phe Ile Leu Ala Leu Lys Val Leu Phe Lys Ala Gln Leu Glu Lys Ala	
160 165 170	
gga gtg gag cat cag ctc aga aga gaa gta gaa ata cag tcc cac ctt	820
Gly Val Glu His Gln Leu Arg Arg Glu Val Glu Ile Gln Ser His Leu	
175 180 185	
cgg cat cct aat att ctt aga ctg tat ggt tat ttq cat gat gct acc	868
Arg His Pro Asn Ile Leu Arg Leu Tyr Gly Tyr Phe His Asp Ala Thr	
190 195 200	
aga gtc tac cta att ctg gaa tat gca cca ctt gga aca gtt tat aga	916
Arg Val Tyr Leu Ile Leu Glu Tyr Ala Pro Leu Gly Thr Val Tyr Arg	
205 210 215 220	
gaa ctt cag aaa ctt tca aag ttt gat gag cag aga act gct act tat	964
Glu Leu Gln Lys Leu Ser Lys Phe Asp Glu Gln Arg Thr Ala Thr Tyr	
225 230 235	
ata aca gaa ttg gca aat gcc ctg tct tac tgt cat tcg aag aga gtt	1012
Ile Thr Glu Leu Ala Asn Ala Leu Ser Tyr Cys His Ser Lys Arg Val	
240 245 250	
att cat aga gac att aag cca gag aac tta ctt ctt gga tca gct gga	1060
Ile His Arg Asp Ile Lys Pro Glu Asn Leu Leu Leu Gly Ser Ala Gly	
255 260 265	
gag ctt aaa att gca gat ttt ggg tgg tca gta cat gct cca tct tcc	1108
Glu Leu Lys Ile Ala Asp Phe Gly Trp Ser Val His Ala Pro Ser Ser	
270 275 280	
agg agg acc act ctc tgt ggc acc ctg gac tac ctg ccc cct gaa atg	1156
Arg Arg Thr Thr Leu Cys Gly Thr Leu Asp Tyr Leu Pro Pro Glu Met	
285 290 295 300	
att gaa ggt cgg atg cat gat gag aag gtg gat ctc tgg agc ctt gga	1204
Ile Glu Gly Arg Met His Asp Glu Lys Val Asp Leu Trp Ser Leu Gly	
305 310 315	
gtt ctt tgc tat gaa ttt tta gtt ggg aag cct cct ttt gag gca aac	1252
Val Leu Cys Tyr Glu Phe Leu Val Gly Lys Pro Pro Phe Glu Ala Asn	
320 325 330	

aca tac caa gag acc tac aaa aga ata tca cgg gtt gaa ttc aca ttc 1300
 Thr Tyr Gln Glu Thr Tyr Lys Arg Ile Ser Arg Val Glu Phe Thr Phe
 335 340 345

cct gac ttt gta aca gag gga gcc agg gac ctc att tca aga ctg ttg 1348
 Pro Asp Phe Val Thr Glu Gly Ala Arg Asp Leu Ile Ser Arg Leu Leu
 350 355 360

aag cat aat ccc agc cag agg cca atg ctc aga gaa gta ctt gaa cac 1396
 Lys His Asn Pro Ser Gln Arg Pro Met Leu Arg Glu Val Leu Glu His
 365 370 375 380

ccc tgg atc aca gca aat tca tca aaa cca tca aat tgc caa aac aaa 1444
 Pro Trp Ile Thr Ala Asn Ser Ser Lys Pro Ser Asn Cys Gln Asn Lys
 385 390 395

gaa tca gct agc aaa cag tct tag gaa tcg tgc agg ggg aga aat cct 1492
 Glu Ser Ala Ser Lys Gln Ser
 400

tga gccagggctg ccatataacc tgacaggaac atgctactga agttttatattt 1545

accattgact gctgccctca atctagaacg ctacacaaga aatatttggtt ttactcagca 1605

gggtgtgcctt aacctcccta ttcagaaagc tccacatcaa taaacatgac actctgaagt 1665

gaaagtagcc acgagaattg tgctacttat actgggttcat aatctggagg caagggttcga 1725

ctgcagccgc cccgtcagcc tgtgctaggc atgggtgtctt cacaggaggc aaatccagag 1785

cctggctgtg gggaaagtga ccactctgcc ctgaccccgga tcagttaagg agctgtgcaa 1845

taaccttcct agtacctgag tgagtgtgta acttattggg ttggcgaagc ctggtaaagc 1905

tggttggaatg agtatgtgat tctttttaag tatgaaaata aagatatatg tacagacttg 1965

tattttttct ctgggtggcat tcctttagga atgctgtgtg tctgtccggc accccggtag 2025

gcctgattgg gtttctagtc ctccttaacc acttatctcc catatgagag tgtgaaaaat 2085

aggaacacgt gctctacctc catttaggga tttgcttggg atacagaaga ggccatgtgt 2145

ctcagagctg ttaagggctt atttttttaa aacattggag tcatagcatg tgtgtaaaact 2205

ttaaatatgc aaataaataa gtatctatgt ctaaaaaaaa aaaaaaaaa 2253

<210> 2

<211> 403

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asp Arg Ser Lys Glu Asn Cys Ile Ser Gly Pro Val Lys Ala Thr
 1 5 10 15

Ala Pro Val Gly Gly Pro Lys Arg Val Leu Val Thr Gln Gln Ile Pro
 20 25 30

Cys Gln Asn Pro Leu Pro Val Asn Ser Gly Gln Ala Gln Arg Val Leu
 35 40 45
 Cys Pro Ser Asn Ser Ser Gln Arg Val Pro Leu Gln Ala Gln Lys Leu
 50 55 60
 Val Ser Ser His Lys Pro Val Gln Asn Gln Lys Gln Lys Gln Leu Gln
 65 70 75 80
 Ala Thr Ser Val Pro His Pro Val Ser Arg Pro Leu Asn Asn Thr Gln
 85 90 95
 Lys Ser Lys Gln Pro Leu Pro Ser Ala Pro Glu Asn Asn Pro Glu Glu
 100 105 110
 Glu Leu Ala Ser Lys Gln Lys Asn Glu Glu Ser Lys Lys Arg Gln Trp
 115 120 125
 Ala Leu Glu Asp Phe Glu Ile Gly Arg Pro Leu Gly Lys Gly Lys Phe
 130 135 140
 Gly Asn Val Tyr Leu Ala Arg Glu Lys Gln Ser Lys Phe Ile Leu Ala
 145 150 155 160
 Leu Lys Val Leu Phe Lys Ala Gln Leu Glu Lys Ala Gly Val Glu His
 165 170 175
 Gln Leu Arg Arg Glu Val Glu Ile Gln Ser His Leu Arg His Pro Asn
 180 185 190
 Ile Leu Arg Leu Tyr Gly Tyr Phe His Asp Ala Thr Arg Val Tyr Leu
 195 200 205
 Ile Leu Glu Tyr Ala Pro Leu Gly Thr Val Tyr Arg Glu Leu Gln Lys
 210 215 220
 Leu Ser Lys Phe Asp Glu Gln Arg Thr Ala Thr Tyr Ile Thr Glu Leu
 225 230 235 240
 Ala Asn Ala Leu Ser Tyr Cys His Ser Lys Arg Val Ile His Arg Asp
 245 250 255
 Ile Lys Pro Glu Asn Leu Leu Leu Gly Ser Ala Gly Glu Leu Lys Ile
 260 265 270
 Ala Asp Phe Gly Trp Ser Val His Ala Pro Ser Ser Arg Arg Thr Thr
 275 280 285
 Leu Cys Gly Thr Leu Asp Tyr Leu Pro Pro Glu Met Ile Glu Gly Arg
 290 295 300
 Met His Asp Glu Lys Val Asp Leu Trp Ser Leu Gly Val Leu Cys Tyr
 305 310 315 320
 Glu Phe Leu Val Gly Lys Pro Pro Phe Glu Ala Asn Thr Tyr Gln Glu
 325 330 335
 Thr Tyr Lys Arg Ile Ser Arg Val Glu Phe Thr Phe Pro Asp Phe Val
 340 345 350

Thr Glu Gly Ala Arg Asp Leu Ile Ser Arg Leu Leu Lys His Asn Pro
355 360 365

Ser Gln Arg Pro Met Leu Arg Glu Val Leu Glu His Pro Trp Ile Thr
370 375 380

Ala Asn Ser Ser Lys Pro Ser Asn Cys Gln Asn Lys Glu Ser Ala Ser
385 390 395 400

Lys Gln Ser

reçue le 11/03/03



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1/1

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

09 113 W /264

Vos références pour ce dossier
(facultatif)

IFB 02 BN CR AURA

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

02/07212

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

ANTICORPS MONOCLONAL ANTI-AURORA-A, SON PROCÉDE D'OBTENTION, ET SES
UTILISATIONS DANS LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DES CANCERS

LE(S) DEMANDEUR(S) :

CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
3, rue Michel-Ange
F-75794 PARIS CEDEX 16, France

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs
utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).

Nom	PRIGENT	
Prénoms	Claude	
Adresse	Rue	1, rue Angéla Duval
	Code postal et ville	35235 THORIGNE-FOUILARD
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom	MARTIN	
Prénoms	Anne	
Adresse	Rue	26, rue Baudelaire
	Code postal et ville	35700 RENNES
Société d'appartenance (facultatif)		
Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
Paris, le 11 mars 2003 Charles DEMACHY, Mandataire 422.5/PP170 